

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ИНТЕРФАЗНЫХ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ В КЛЕТКАХ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОЧКИ СВИНЫ (ЛИНИЯ СПЭВ)

© С. Ю. Демин,<sup>1</sup> В. Н. Стефанова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

<sup>1, 2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин;

<sup>2</sup> электронный адрес: vestefan@mail.ru

Прометафазный кариотип линии СПЭВ содержит две гетероморфные пары ядрышковых организаторов, принадлежащих хромосомам 8а и 8, 10<sub>L</sub> и 10<sub>S</sub>. Явлением гетероморфизма воспользовались для хромосомной дифференциации интерфазных ядрышковых организаторов (ИЯО). Были исследованы двухмерные (2D) препараты фиксированных метанолом клеток СПЭВ, растянутых на поверхности предметного стекла без применения гипотонии. Значительная часть интерфазных клеток на 2D-препаратах содержала 3—4 структуры линейной конфигурации, расположенные в доменах ядрышек. Эти структуры были позитивными при наблюдении методом фазового контраста и после окрашивания DAPI. С помощью рДНК-FISH было установлено, что они представляют собой ИЯО. Самый крупный из ИЯО индивидуальной клетки обычно содержал яркий терминальный сигнал рДНК-FISH/DAPI-окрашивания, что указывает на его принадлежность хромосоме 8а. Известно, что в реакции серебрения ядрышек на мазках периферических лимфоцитов человека, осуществленной после фиксации метанолом, участвуют в основном белки фибриллярных центров. Показано, что такая же специфичность серебрения ядрышек скорее всего характерна и для 2D-препараторов клеток СПЭВ, фиксированных метанолом. Как посеребренные, так и окрашенные методом рДНК-FISH, ИЯО имели либо четковидную, либо дискоидальную структуру разной степени разрешения. Дискоидальные ИЯО состояли из поперечных аргентофильных структур — плотных дисков и рыхлых междисков. В высокоразрешенных дискоидальных ИЯО наблюдали продольное расщепление (двунитчатость) зоны междисков. Четковидные ИЯО состояли из аргентофильных бусин, которые были примерно вдвое уже аргентофильных дисков, и однонитчатой или Ag-негативной зоны между бусинами. Среди ИЯО с высоким разрешением структуры были найдены четыре воспроизведимых паттерна серебрения, которые можно было объединить в две гомологичные группы. Поскольку каждый из таких паттернов был к тому же уникальным для индивидуальной клетки, сделано заключение о том, что они являются хромосомоспецифичными. С использованием данных прометафазного анализа была определена хромосомная принадлежность ИЯО воспроизводимых паттернов серебрения. ИЯО, принадлежащие разным хромосомам, были сопоставлены между собой по средней длине и среднему числу аргентофильных бусин, а также по отношению длин и отношению числа аргентофильных бусин, рассчитанным для разных пар ИЯО индивидуальной клетки. Оба отношения, определенные для наиболее гетероморфной пары гомологичных хромосом 8а и 8, составляли лишь  $1.26 \pm 0.02$ . Для сравнения: аналогичное 8а/8 отношение длин ядрышковых организаторов, рассчитанное для индивидуальных прометафазных клеток, было равно  $2.92 \pm 0.30$ .

**Ключевые слова:** гетерохроматинизация, рибосомный хроматин, интерфазные ядрышковые организаторы, 2D FISH.

**Принятые сокращения:** ИЯО — интерфазный ядрышковый организатор; ПФК — плотный фибриллярный компонент ядрышка; ФГА — фитогемагглютинин; ФЦ — фибриллярный центр ядрышка; ЯО — ядрышковый организатор; ЯО-хромосома — хромосома, содержащая ЯО; Ag<sup>+</sup>-ЯО или Ag<sup>+</sup>-ИЯО — серебрящиеся ЯО или ИЯО; DAPI — 4',6'-диамино-2-фенилindол; 2D FISH — двухмерный (2D) вариант флуоресцентной *in situ*-гибридизации (нуклеиновых кислот) на препаратах спредов интерфазных ядер и митотических хромосом.

Ядрышко — самый крупный домен клеточного ядра, основными функциями которого являются синтез 45—47S пре-рРНК и биогенез прерибосом. В большей части клеток это еще и самая плотная структура. Сухая масса ядрышка составляет 35—90 %, что в несколько раз больше, чем у других некристаллических структур клетки (Бродский, 1965). Ядрышко представляет собой полу-

твердое тельце, которое можно изолировать с помощью механических процедур (Scherl et al., 2002). Вместе с тем оно способно к временному разжижению, о чем свидетельствует формирование ядрышками амебоидных отростков (протрузий), а также феномен миграции и слияния ядрышек (De Boni, 1994). Целостность ядрышка в клетке достигается главным образом не путем стабилизации

связей между составляющими его макромолекулами, а в результате динамического равновесия прямого и обратного транспорта макромолекул в направлении нуклеоплазма—ядрышко (Olson, Dundr, 2005). При экспериментальном нарушении такого транспорта или его нормальном изменении, например при вступлении в митоз, происходит быстрая частичная или полная деградация ядрышек. И наоборот, восстановление указанного транспорта в эксперименте или при выходе из митоза приводит к постепенной реорганизации ядрышек в клеточном ядре (DiMario, 2004). Формирование ядрышек в телофазном ядре происходит вокруг участков хромосом, получивших название ядрышковых организаторов (ЯО), или ядрышкообразующих районов хромосом. Локус ЯО содержит кластер генов рРНК.

Изучение структурно-функциональной организации ядрышка — одно из самых сложных экспериментальных направлений исследования клеточного ядра. Это связано как с физическими характеристиками этого тельца и динамичностью его структуры, так и с величиной его протеома. Так, по новейшим оценкам, протеом ядрышка из клеток HeLa состоит из не менее чем 489 белков (Andersen et al., 2005), из которых в функциональном отношении изучен лишь 121 белок (Leung et al., 2003). Последние экспериментальные данные и литературу о пространственно-временной организации рибосомного хроматина *in situ* в активных ядрышках можно найти в работе Плисс и соавторов (Pliss et al., 2005), выполненной на клетках HeLa. Согласно этим данным, ядрышковая рДНК существует в виде мультигенных хроматиновых структур высокого порядка. Большая часть этих структур содержит активный хроматин и реплицируется в первой половине фазы S клеточного цикла, меньшая часть содержит нетранскрибуемый хроматин и реплицируется во второй половине фазы S. Транскрибуирующийся рибосомный хроматин располагается на поверхности описанных выше мультигенных структур. По ультраструктурным данным, эта поверхность соответствует границе между плотным фибрillярным компонентом (ПФК) и фибрillярными центрами (ФЦ) ядрышка. Эти представления об организации рибосомного хроматина подтверждаются данными эпигенетических исследований (Nemeth et al., 2004; Li et al., 2005). По этим данным, негативная регуляция генов рРНК осуществляется при посредстве АТФ-зависимого комплекса ремоделирования хроматина NoRC (nucleolar chromatin remodeling complex), который индуцирует «глушение» транскрипции через гетерохроматинизацию промоторов рибосомных генов. Этот же комплекс маркирует позднореплицирующийся рибосомный хроматин и, по-видимому, определяет как время репликации рДНК, так и эпигенетическое наследование инактивированного состояния такого хроматина.

Известно, что уровень активности реорганизованных ядрышек остается стабильно низким в течение телофазы и в ранней фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла (Grummt, 2003). Повышение этого уровня происходит скачкообразно в середине фазы G<sub>1</sub> в клетках человека обычно после миграции и слияния ядрышек. Из этого следует, что высокоактивные ядрышки, как правило, содержат несколько ЯО. Распределение рДНК в таких ядрышках имеет весьма сложный характер (Ploton et al., 2004). При такой ситуации идентификация индивидуальных ЯО в активном ядрышке клеток человека представляется весьма проблематичной, так же как и получение точных сведений о длине ак-

тивизированных интерфазных ядрышковых организаторов (ИЯО). Для полноты картины следует отметить, что определение длины индивидуальной хромосомы или ее определенного участка в интерфазном ядре на двух (2D)- и трехмерных (3D) препаратах клеток — это сложная техническая задача (Lemke et al., 2002). Связано это с тем, что корректное трассирование (длины) возможно лишь для индивидуальных интерфазных хромосом с воспроизведимым рисунком сегментирования. Современные методы получения такого рисунка у интерфазных хромосом разработаны недавно и основаны на использовании многоцветных вариантов FISH (Lemke et al., 2002; Lowenstain et al., 2004). Такой подход, однако, совершен но непригоден для трассирования активных ИЯО, представляющих собой кластеры генов рРНК, перемежающихся с высоковариабельными последовательностями некодирующей ДНК (Sylvester et al., 2004).

В настоящей работе была поставлена задача установления хромосомной принадлежности индивидуальных ИЯО в клетках млекопитающих. В качестве объекта исследований были выбраны клетки эмбриональной почки домашней свиньи (перевиваемая линия СПЭВ). Этот объект имеет ряд кариотипических особенностей, сильно облегчающих исследование структурно-функциональной организации ИЯО. Особенно хорошо эти особенности видны при сопоставлении клеток СПЭВ с перевиваемыми клетками человека. Так, в кариотипе СПЭВ содержатся две пары ЯО-хромосом, тогда как в культуре клетках человека их не менее пяти (Мамаева, 2002). Обе пары ЯО-хромосом СПЭВ гетероморфны по размеру ЯО (Стефанова, Демин, 2006). Такой гетероморфизм гомологичных ЯО-хромосом в линиях человека не установлен. В нормальном кариотипе человека в активном состоянии находится 6–8 ЯО-хромосом (Heliot et al., 2000), в кариотипе СПЭВ — 3–4 ИЯО-хромосомы (Стефанова, Демин, 2006). Для клеток человека характерно слияние ядрышек в фазе G<sub>1</sub> (DiMario, 2004), тогда как в клетках линии СПЭВ, по нашим данным, такого слияния ядрышек довольно часто не происходит. Наконец, для клеток СПЭВ (но не человека) неоднократно получали изображения ИЯО, имевших линейную или близкую к ней конфигурацию (Zatsepina et al., 1990, 1996).

## Материал и методика

Работа выполнена на постоянной клеточной линии СПЭВ, произошедшей из ткани эмбриональной почки домашней свиньи. Использовали монослойную культуру СПЭВ из коллекции банка клеточных культур Института цитологии РАН. Для приготовления препаратов использовали клетки 2-суточной культуры, которую вели в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C на среде, содержащей RPMI 1640 и 10 % сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», Россия). Для получения препаратов клеток СПЭВ с растянутыми ядрами применяли разработанный нами ранее метод, в котором нет этапа гипотонической обработки клеток (Демин, 1997, 1999), с некоторыми модификациями. Клетки СПЭВ снимали с подложки с помощью тefлонового шпателя и переносили пипеткой в пластиковые микропобирки Eppendorf. Закрытые крышечкой пробирки переворачивали и встряхивали до получения суспензии клеток, которую затем быстро осаждали с помощью центрифуги для микропробирок (Elphi, Латвия). Осадок

клеток отделяли от супернатанта и перемешивали с помощью вортекса. К ресуспендированному клеточному осадку объемом 100 мкл добавляли 100 мкл 0.1%-ного раствора неполярного детергента Тритона X-100 (Ferak, Германия), свежеприготовленного на переосажденной питательной смеси, в которой проходило культивирование этих клеток. Суспензию клеток в детергенте в течение 0.5—1.0 мин пипетировали в капиллярном объеме пастеровской пипетки, а затем выливали в пробирку с метанолом и тщательно встряхивали. После этого клетки однократно пересаждали в метаноле и после удаления 80 мкл супернатанта осторожно перемешивали. Полученную суспензию клеток раскладывали на поверхность предметных стекол, смоченных 2%-ным водным раствором Тритона X-100. Раствор детергента и излишки фиксатора удаляли с препаратов с помощью полосок фильтровальной бумаги, которые размещали на периферии предметного стекла. Препараты для двухмерной (2D) FISH готовили по такой же схеме, однако вместо метанола использовали фиксирующую смесь (метанол—ледяная уксусная кислота; 3 : 1). Полученные суховоздушные препараты хранили в герметично запечатанном боксе при  $-20^{\circ}\text{C}$  вплоть до использования.

Распределение ДНК в ядре и ядрышке изучали на препаратах, окрашенных DAPI (Sigma, США), при максимальном оптическом разрешении широкопольного микроскопа. Окрашивание осуществляли путем 10-минутной инкубации препаратов в 0.1 М буферном растворе PBS (рН 7.0), содержащем DAPI в концентрации 0.1 мкг/мл. Окрашенные препараты ополаскивали PBS и заключали в пропилгалат (Sigma, США) под покровное стекло для проведения наблюдений методами фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Морфометрические измерения серийных оптических сечений ядер, сфотографированных с шагом 0.5 мкм, осуществляли с помощью программы ImageTool 3.0. На основании полученных измерений определяли максимальное (по площади) оптическое сечение клетки или ядра и его морфометрические параметры. ЯО митотических и интерфазных хромосом окрашивали азотникислым серебром (Howell, Black, 1980).

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* с биотинилированной пробой 28S + 18S рДНК из космидной библиотеки норки (Christensen et al., 1996) осуществляли по протоколу, подробно описанному в предыдущем сообщении (Стефанова, Демин, 2006). Фотографирование препаратов проводили на микроскопах Axiophot (Opton) и Vanox T (Olympus) с помощью как пленочной, так и цифровой камеры (4-мегапиксельная камера Olympus C-4000Z с 8-битным цветом). Клетки, окрашенные азотникислым серебром, фотографировали на пленку микрат-изопан, а препараты FISH — на пленку А2Ш («Тасма», Россия). Полученные негативы оцифровывали с помощью сканера для пленок ScanWit 2720S (Acer) с оптическим разрешением 2700 dpi. Разрешение полученных изображений при этом составляло 27 пикселей на 1 мкм объекта.

Морфометрические измерения посеребренных ЯО и доменов рДНК осуществляли с помощью программ AdobePhotoshop 5.0 LE и ImageTool 3.0. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica 5.0 и Excel. Определение статистически значимой разницы средних значений изучаемых параметров осуществляли с помощью *t*-теста (критерия Стьюдента).

## Результаты

На полученных нами препаратах клеток СПЭВ, обработанных Тритоном X-100 и зафиксированных метанолом, преобладали скопления клеток с эллипсоидным или сферическим ядром диаметром 9—16 мкм. Наряду с ними на препаратах в значительном количестве встречались одиночные клетки с ядром, сплющенным до высоты 2—3 мкм. Сплющенные ядра наблюдали также у отдельных клеток на периферии клеточных скоплений. Распределение ДНК в ядрышках клеток со сплющенным ядром чаще всего имело двухмерный (2D) для световой микроскопии характер в отличие от остальных клеток, где оно было явно трехмерным (3D). В связи с тем что 2D-объекты анализировать гораздо проще, чем 3D-объекты, в настоящей работе мы сосредоточились на изучении ЯО клеток со сплющенным ядром. Среди них нами были найдены клетки трех типов. В приведенной ниже характеристике выделенных типов указаны латеральные размеры клеток и ядер в плоскости максимального (по площади) оптического сечения последних по оси *x*, *y* с ветвевого микроскопа.

Клетки первого типа округлые, содержат один широкий и короткий цитоплазматический отросток с оптически плотной эндоплазмой и полуупрозрачной эктоплазмой и один или несколько мелких цитоплазматических отростков такого же строения (рис. 1, *a*—*г*). Размер клетки — 11—13 мкм по малому диаметру и 13—15 мкм по большому, размер ядра — (10—11)×(11—12) мкм. В плоскости препарата ядро имеет овальную или (реже) округлую конфигурацию. Контур ядра ровный, с незначительными выступами и инвагинациями. Ближе к экваториальному сечению ядра наблюдаются 2—3 компактных ядрышка и 1 нуклеолонемное. В ядрышках более мелких клеток этого типа выявляются 3 или 4 DAPI-позитивные линеаризованные четковидные структуры (рис. 1, *б*). При этом в самой крупной (по площади) структуре обычно выявляется ярко флуоресцирующий блок хроматина. В более крупных клетках этого типа наблюдается только одна, реже две линеаризованные четковидные структуры в ядрышках, примыкающих к периферии ядра (рис. 1, *г*). Распределение ДНК в остальных ядрышках крупных клеток имеет диффузный характер. Во всех клетках данного типа выявляются внутриядерные и периферические конденсаты хроматина.

Клетки второго типа — крупные, (15—17)× (20—24) мкм, с ацентрично расположенным овальным ядром (10—11)×(11—12) мкм (рис. 1, *ж*, *и*), содержат один крупный отросток цитоплазмы в виде широкого языка, отходящего от границы ядра на 7—9 мкм. Эндоплазма неоднородная, волокнистая. Эктоплазма однородная, оптически плотная, содержит один или несколько коротких выступов. Среди клеток данного типа можно выделить два подтипа, четко различающихся между собой по структуре хроматина и ядрышек. Клетки первого подтипа почти не содержат конденсатов хроматина внутри и на периферии ядра (рис. 1, *ж*, *з*). В них обнаруживаются 2—4 нуклеолонемных ядрышка с линеаризованными DAPI-позитивными структурами (рис. 1, *ж*, *з*). Клетки второго подтипа, напротив, содержат значительное количество конденсированного хроматина внутри и на периферии ядра (рис. 1, *и*, *к*). В них обнаруживаются 1—2 компактных и 1—3 нуклеолонемных ядрышка, распределение ДНК в которых имеет четковидный характер (рис. 1, *и*, *к*). При этом в самом крупном из компактных

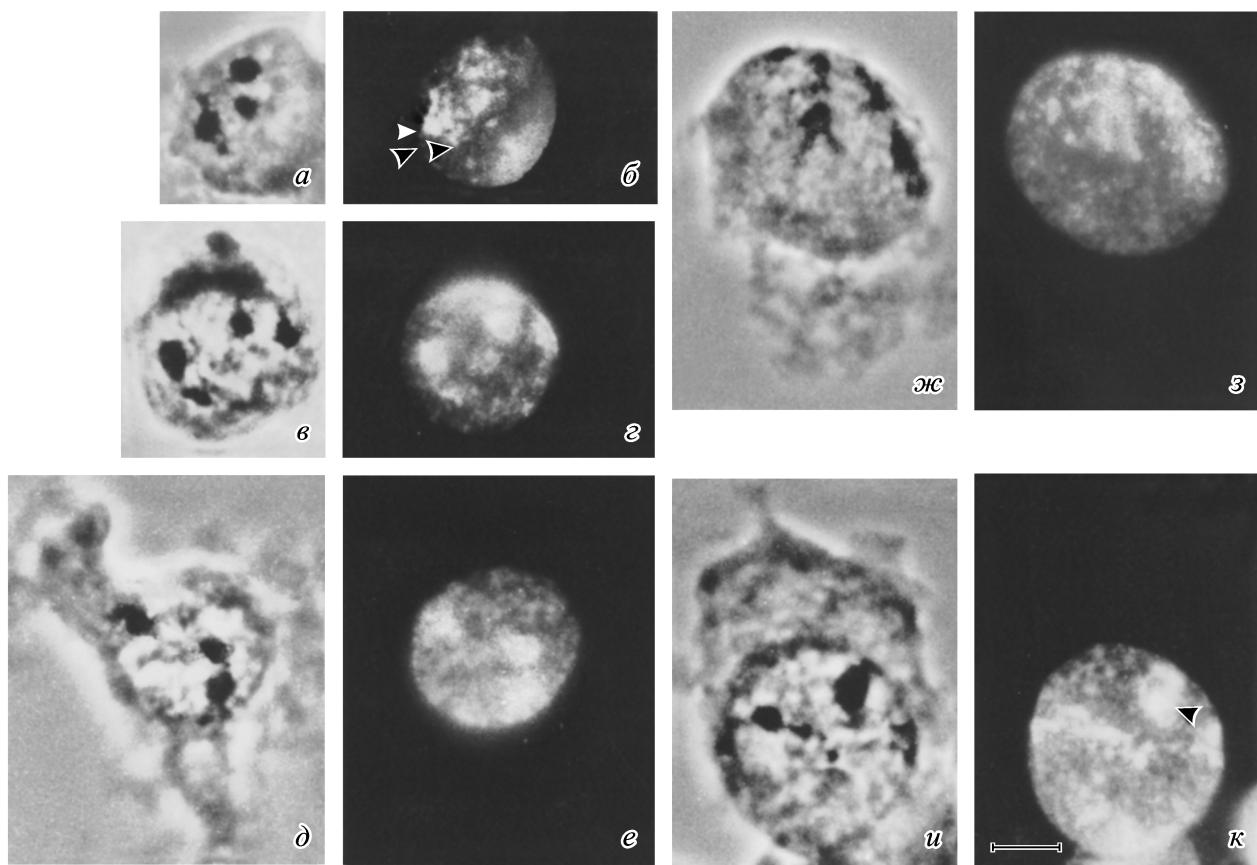


Рис. 1. Фиксированные метанолом клетки линии СПЭВ, растянутые по поверхности предметного стекла и сильно уплощенные без предобработки в условиях гипотонии, содержат фазово-контрастные и DAPI-позитивные линейные структуры в домене ядрышек.

*a—*ε** — две клетки типа I: клетка (*a*, *b*) предположительно зафиксирована в раннем периоде G<sub>1</sub> клеточного цикла, клетка (*ε*, *ζ*) — во второй половине периода G<sub>1</sub>; *δ*, *ε* — характерная клетка типа III, предположительно зафиксирована в первой половине S-периода клеточного цикла; *ж—κ* — клетки типа II: клетка (*ж*, *ζ*) принадлежит подтипу I, который, скорее всего, объединяет клетки, зафиксированные в позднем S-периоде; клетка (*η*, *κ*) принадлежит подтипу II, группирующему клетки, зафиксированные в G<sub>2</sub>-периоде; головки стрелок указывают на ярко флуоресцирующий терминальный сигнал на самой крупной из линейных DAPI-позитивных структур в домене ядрышек. Одни и те же клетки наблюдали методом фазового контраста (*a*, *δ*, *ж*, *η*) и после окрашивания DAPI (*b*, *ε*, *ζ*, *κ*). Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 1. Phase contrast and DAPI-positive linear structures in the nucleolar domain of methanol fixed PK cells that were surface stretched and heavily flattened without hypotonic pretreatment.

The same individual cells are shown in phase contrast and after DAPI-staining. *a—*ε** — two cells of type I: putative early (*a*, *b*) and middle-late G<sub>1</sub> cell (*ε*, *ζ*); *δ*, *ε* — characteristic cell of type III: putative early-middle S phase cell; *ж—κ* — cells of type II: cell (*ж*, *ζ*) belongs to subtype I that combines putative late S phase cells, while cell (*η*, *κ*) belongs to subtype II that groups putative G<sub>2</sub> cells; arrowheads indicate prominent terminal signal on the largest linear DAPI-positive structure in the nucleolar domain. *a*, *ε*, *δ*, *ж*, *η* — phase contrast; *b*, *ε*, *ζ*, *κ* — DAPI-staining. Scale bar — 5 μm.

ядрышек в составе четковидной DAPI-позитивной структуры обычно выявляется ярко флуоресцирующий блок хроматина.

Клетки третьего типа — промежуточные по размерам ядра и цитоплазмы между клетками первого и второго типов (рис. 1, *δ*). По строению цитоплазмы они ближе к клеткам первого типа, по развитости и площади отростков цитоплазмы — к клеткам второго типа; часто содержат несколько отростков, что характерно для полуживых клеток. Судя по этому признаку, клетки данного типа способны к активной миграции. Они содержат преимущественно компактные ядрышки (3—4), диффузно окрашивающиеся DAPI, а также значительное количество конденсаторов хроматина на периферии и внутри ядра (рис. 1, *ε*).

Для соотнесения колокализующихся с ядрышком DAPI-позитивных структур с интерфазными ИЯО, под которыми в настоящем времени понимают локусы рДНК

(Hernandez-Verdun, Roussel, 2003), было осуществлено рДНК-FISH-окрашивание. Было показано, что с помощью этого метода выявляются аналогичные ядрышковые структуры (рис. 2, *а—в*). В ходе анализа препаратов 2D FISH было обнаружено также, что явно редуплицированные линеаризованные ИЯО не имели никаких признаков расщепления сестринских хроматид. Такие ИЯО выглядели как поперечно исчерченные, а не четковидные структуры (рис. 2, *г*). Таким образом, с учетом данных рДНК-FISH линеаризованные DAPI-позитивные структуры, колокализующиеся с ядрышками в клетках СПЭВ, можно считать ИЯО.

Еще один способ выявления активных ИЯО — дифференциальное окрашивание азотникислым серебром. Репрезентативный вид посеребренного препарата интерфазных клеток СПЭВ, нанесенных на предметное стекло после обработки Тритоном X-100 и фиксации метанолом, представлен на рис. 3. Это изображение получено

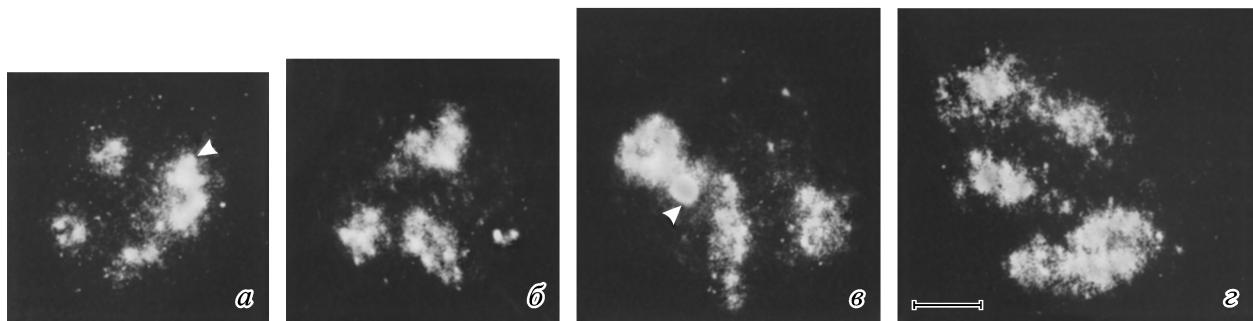


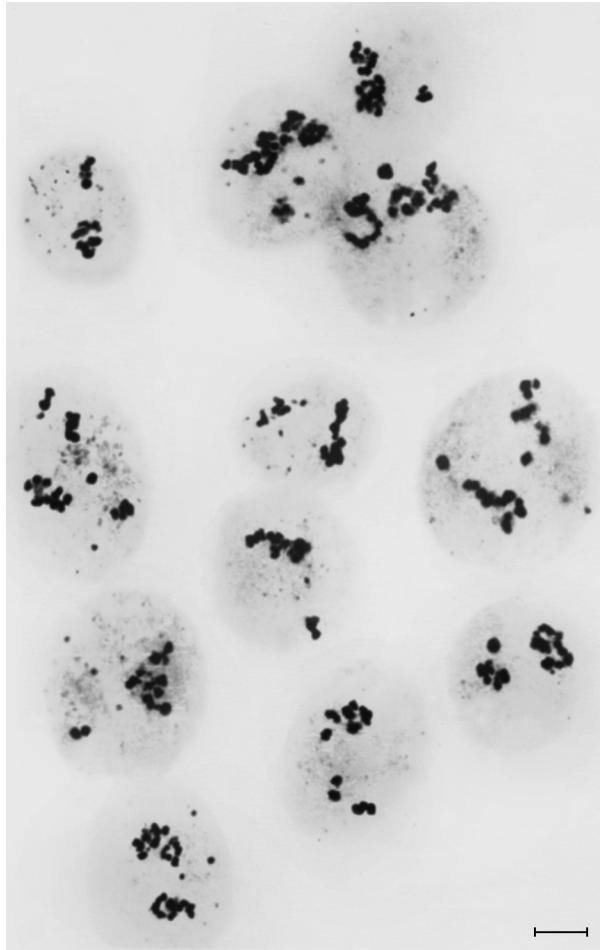
Рис. 2. Домены рДНК-FISH в растянутых интерфазных клетках СПЭВ имеют линейную конфигурацию (а—с) или дискоидальную (д) структуру. Головки стрелок указывают на ярко флуоресцирующий терминальный сигнал на самой крупной из линейных структур в домене рДНК. Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 2. rDNA-FISH domains of surface stretched interphase PK cells with linear and necklace-like configuration (a—c), and banded (d) structure.

*Arrowheads indicate prominent terminal signal on the largest linear structure in rDNA domain. Scale bar — 5 μm.*

при максимальном разрешении обычного, широкопольного микроскопа. Хорошо видно, что посеребренные ИЯО ( $\text{Ag}^+$ -ИЯО) во всех без исключения ядрах находятся в одной фокальной плоскости микроскопа и хорошо расположены.

Таким образом, после процедуры серебрения в кислой среде ядра клеток СПЭВ заметно растягиваются и уплощаются, становясь двухмерными (2D) для широкопольной световой микроскопии.



В 2D-ядрах чаще всего видны четыре, реже три и иногда два ядрышка с  $\text{Ag}^+$ -ИЯО. Линейные размеры  $\text{Ag}^+$ -ИЯО в индивидуальном ядре и в разных ядрах варьируют в широких пределах. Тем не менее почти в каждом ядре можно заметить от 1 до 3 длинных  $\text{Ag}^+$ -ИЯО, которые имеют вид четковидных структур. Эти структуры могут быть уложены в ядрышке в виде меандра с растянутыми, сближенными и даже перекрывающимися витками, а также иметь линейную конфигурацию. Аргентофильные бусины, маркирующие  $\text{Ag}^+$ -ИЯО, могут прилипать одна к другой. Однако чаще они разобщены более светлыми участками, которые либо вовсе не окрашены, либо содержат одну или же две более слабо окрашенные нитевидные хроматиды (рис. 4). В последнем случае они могут располагаться параллельно либо иметь вид плектонемической спирали. Хроматиды, выявляемые в составе  $\text{Ag}^+$ -ИЯО, также неоднородны. Они могут содержать более темные утолщения, которые в однонитчатых участках или в месте перекрута двунитчатых хроматид обычно выглядят как одиночная бусина, а в двунитчатых участках расположены колатерально или имеют вид спаренных бусин. Аргентофильные сегменты в составе «двунитчатых» линеаризованных ИЯО имели вид попечерных дисков и(или) крупных бусин. В некоторых случаях можно было различить, что последние представляют собой стопку сближенных дисков. Ширина «двунитчатого»  $\text{Ag}^+$ -ИЯО в зоне аргентофилии примерно вдвое превосходила таковую в «однонитчатых»  $\text{Ag}^+$ -ИЯО (рис. 4). Аргентофильные сегменты в составе «однонитчатых»  $\text{Ag}^+$ -ИЯО имели вид бусин 0.6—0.8 мкм в форме шарика или чечевички. Кроме «однонитчатых» и «двунитчатых» ИЯО встречались  $\text{Ag}^+$ -ИЯО смешанного типа, содержащие двунитчатые и однонитчатые участки и аргентофильные зоны обоих вышеуказанных типоразме-

Рис. 3. Репрезентативный вид 2D-препарата клеток СПЭВ, фиксированных метанолом, после окрашивания серебром (Howell, Black, 1980).

*Масштабная линейка — 5 мкм.*

Fig. 3. Representative view of 2D preparation of methanol fixed PK cells after silver staining of nucleolus organizers. According to: Howell, Black, 1980.

*Scale bar — 5 μm.*

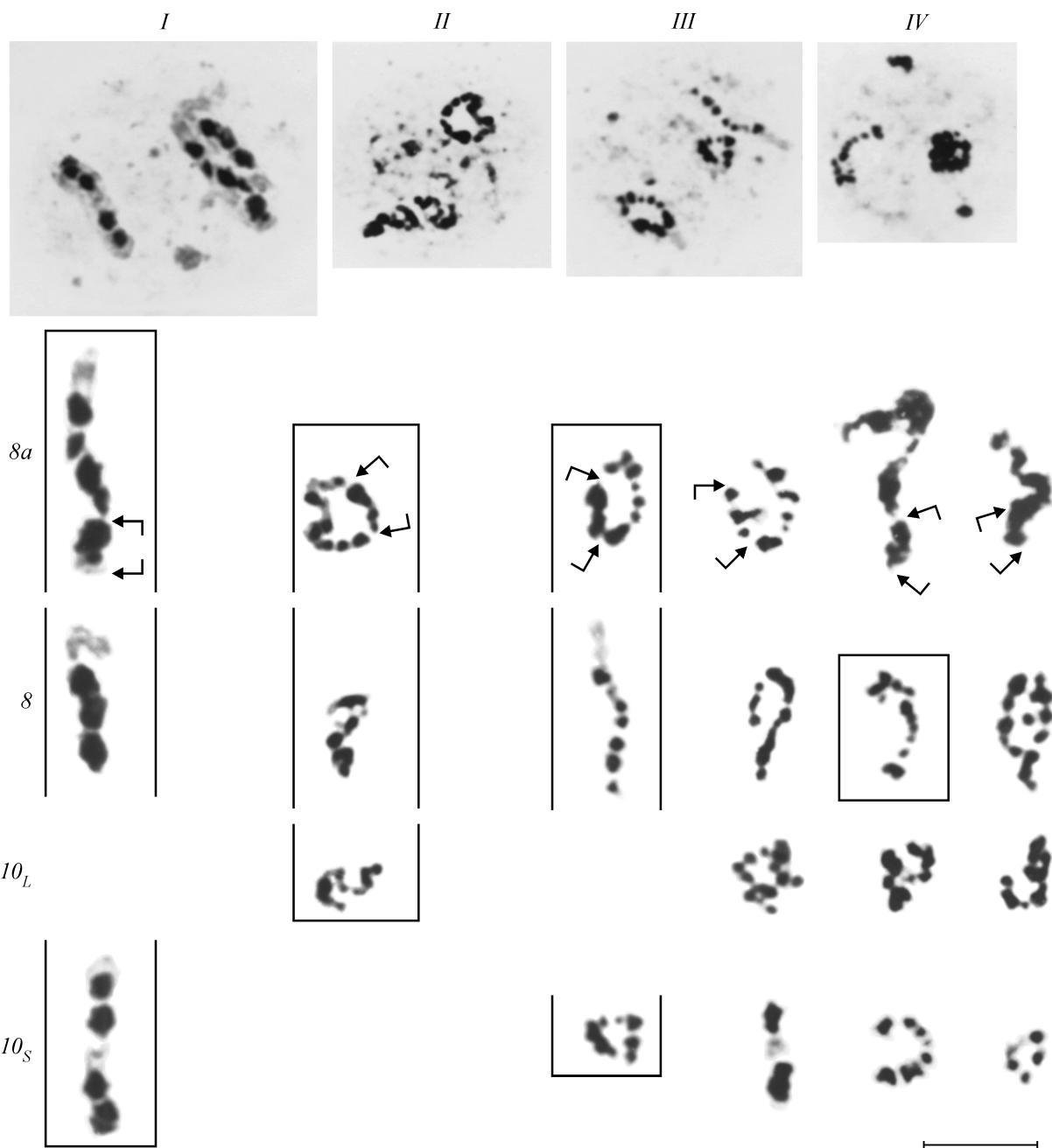


Рис. 4. Хромосомная принадлежность воспроизводимых паттернов серебрения интерфазных ядрышковых организаторов (ИЯО) из клеток СПЭВ, фиксированных метанолом.

I—IV — характерные изображения 2D-ядра с четырьмя ядрышками, часть из которых содержит дискоидальные (I) или четковидные (II—IV) ИЯО линейной конфигурации; обрамленные ИЯО принадлежат клеткам I—IV. 8а и 8 или 10<sub>L</sub> или 10<sub>S</sub> — маркировка рядов ИЯО для гомологовых пар хромосом 8 или 10; ряды ИЯО объединяют гомологичные структуры; стрелки указывают на границы амплифицированного участка в составе ИЯО. Масштабная линейка — 5 мкм.

Fig. 4. Chromosomal affiliation of reproducible silver staining patterns of interphase nucleolus organizers (INO) of methanol fixed PK cells.

I—IV — characteristic images of 2D nucleus with four nucleoli, containing banded (I) or beaded (II—IV) INOs of linear configuration; framed INOs belong to cells (I—IV). 8a and 8, or 10<sub>L</sub> and 10<sub>S</sub> mark rows for heteromorphous pairs of chromosomes 8 or 10, INOs rows unite homologous structures; arrows show boundaries of an amplified region of INO. Scale bar — 5 μm.

ров. Всего нами было изучено 478 изображений растянутых ядер. При этом 151 из них содержало хотя бы один «двувитчатый» ИЯО, среди которых не было найдено ни одного Ag<sup>+</sup>-ИЯО с двунитчатой зоной аргентофилии.

Из 478 проанализированных ядер 105 (21.9 %) содержали от одного до четырех хорошо разрешенных линеа-

ризованных Ag<sup>+</sup>-ИЯО. Мы попытались осуществить хромосомную идентификацию хотя бы некоторых из них по рисунку Ag<sup>+</sup>-ИЯО. Схема и результаты проведенной хромосомной идентификации представлены на рис. 4. На первом этапе были отобраны ядра с четырьмя Ag<sup>+</sup>-ИЯО, минимум три из которых были представлены длинными

**Морфометрическая характеристика линеаризованных интерфазных ядрышковых организаторов (ИЯО)  
установленной хромосомной принадлежности**

Хромосома	Длина ( $L$ ) ИЯО и количество ( $B$ ) различных в нем $\text{Ag}^+$ -бусин												
	индексы для пары хромосом из индивидуальной клетки				статистика и результаты Т-тестирования похромосомных выборок ИЯО								
	$L_i$		$B_i$		размах значений		среднее		O	количество ИЯО	оцениваемая разность средних	$P$ $T \Rightarrow t_{\text{критич.}}$	
	размах значений	среднее	размах значений	среднее	$L$ , мкм	$B$	$L$ , мкм	$B$				$L$ , мкм	$B$
8a					8.6—16.2	17—25	12.78±0.20	20.16±0.28	61				
8					8.1—13.8	13—20	10.69±0.17	16.22±0.21	51				
10 <sub>L</sub>					5.2—11.5	8—15	7.27±0.20	11.56±0.29	54				
10 <sub>S</sub>					4.0—9.6	8—13	6.39±0.28	10.17±0.35	21				
8a/8	1.02—1.74	1.24±0.03	1.12—1.54	1.26±0.02						1.4	3.2	0.99	0.96
8a/10 <sub>L</sub>	1.00—2.42	1.81±0.06	1.31—2.56	1.81±0.06						4.9	7.7	0.96	0.97
8a/10 <sub>L</sub>	1.33—2.62	2.11±0.08	1.67—2.88	2.12±0.09						5.6	9.0	0.97	0.97
8/10 <sub>L</sub>					1.00—2.22	1.44±0.05				2.8	3.8	0.98	0.98
8/10 <sub>S</sub>					1.25—2.50	1.69±0.10				3.6	5.2	0.96	0.95
10 <sub>L</sub> /10 <sub>S</sub>					1.00—1.67	1.20±0.05				0.02	0.8	0.95	0.95

<sup>a</sup> Индексы рассчитаны как отношение длин ( $L_i$ ) или количеств  $\text{Ag}^+$ -бусин ( $B_i$ ) на большем ИЯО к таковому на меньшем ИЯО.

структурами простой конфигурации (рис. 4, ядра I—III). Эти структуры были вырезаны и ранжированы по длине и сходству рисунка ИЯО с учетом того, что  $\text{Ag}^+$ -ИЯО хромосомы 8а должен быть самым длинным и содержать довесок, которого нет на гомологичном ИЯО (рис. 4, раскладки I—III). На втором этапе идентификации мы привлекали ядра с четырьмя  $\text{Ag}^+$ -ИЯО, среди которых два-три были высокоразрешенными и хотя бы одно из них имело линейную конфигурацию (рис. 4, ядро IV). На основании счета  $\text{Ag}^+$ -бусин в высокоразрешенных ИЯО осуществляли предварительную хромосомную идентификацию последних. Предварительные результаты уточняли сопоставлением рисунка серебрения ИЯО, идентифицированных на первом этапе, и тестируемых ИЯО. При высокой гомологии рисунков хромосомную принадлежность тестируемого  $\text{Ag}^+$ -ИЯО считали окончательно установленной, и его изображение помещали в соответствующий гомологичный ряд. По мере заполнения этих рядов формировался банк изображений  $\text{Ag}^+$ -ИЯО известной хромосомной принадлежности. Репрезентативный фрагмент такого банка, удовлетворительно отражающий полиморфизм линеаризованных  $\text{Ag}^+$ -ИЯО, представлен на рис. 4.

Результаты морфометрического анализа ИЯО клеток СПЭВ из банка изображений  $\text{Ag}^+$ -ИЯО установленной хромосомной принадлежности приведены в таблице. По этим данным,  $\text{Ag}^+$ -ИЯО хромосомы 8а в среднем на 1.4 мкм, или в 1.13 раза, длиннее такового хромосомы 8, на 4.9 мкм, или в 1.7 раза, длиннее 10<sub>L</sub>, а также на 5.6 мкм, или в 1.88 раза, больше такового хромосомы 10<sub>S</sub>. Сопоставление длин  $\text{Ag}^+$ -ИЯО других хромосом набора также дало статистически значимую разницу. Так, в среднем длина этих структур различалась между хромосомами 8 и 10<sub>L</sub> на 2.8 мкм, или в 1.38 раза, между хромо-

сомами 8 и 10<sub>S</sub> — на 3.6 мкм, или в 1.56 раза, а между хромосомами 10<sub>L</sub> и 10<sub>S</sub> — на 0.02 мкм, или в 1.03 раза. Когда это представлялось возможным, мы вычисляли отношение длин  $\text{Ag}^+$ -ИЯО для пар линеаризованных хромосом индивидуальной клетки. Этот индекс длин хромосом варьировал в следующем диапазоне значений для хромосомных пар: 8a/8 — от 1.02 до 1.74 со средним  $1.24 \pm 0.03$ ; 8a/10<sub>L</sub> — от 1.00 до 2.42 ( $1.81 \pm 0.06$ ), 8a/10<sub>S</sub> — от 1.33 до 2.62 ( $2.11 \pm 0.08$ ).

Количество  $\text{Ag}^+$ -бусин, приходящихся на один ИЯО, с целью снижения субъективности счета определяли только для ИЯО с высоким разрешением структуры. Оказалось, что ИЯО хромосомы 8а содержал  $\text{Ag}^+$ -бусин в среднем на 3.2, или в 1.2 раза, больше, чем ИЯО хромосомы 8; на 7.7, или в 1.67 раза, больше, чем ИЯО хромосомы 10<sub>L</sub>, и на 9.0 или в 1.88 раза, больше, чем ИЯО хромосомы 10<sub>S</sub>. ИЯО хромосом 8 и 10<sub>L</sub> различались в среднем на 3.8  $\text{Ag}^+$ -бусины, или в 1.33 раза, ИЯО хромосом 8 и 10<sub>S</sub> — на 5.2  $\text{Ag}^+$ -бусины, или в 1.51 раза, и ИЯО хромосом 10<sub>L</sub> и 10<sub>S</sub> — на 0.8  $\text{Ag}^+$ -бусины, или в 1.08 раза. Дополнительно нами было вычислено отношение количества  $\text{Ag}^+$ -бусин на более длинном ИЯО к таковому на меньшем ИЯО в индивидуальной клетке. Этот индекс варьировал в следующем диапазоне значений для сопоставляемых пар хромосом: 8a/8 — 1.12—1.54 со средним значением  $1.26 \pm 0.02$ , 8a/10<sub>L</sub> — 1.31—2.56 ( $1.81 \pm 0.06$ ), 8a/10<sub>S</sub> — 1.67—2.88 ( $2.12 \pm 0.09$ ), 8/10<sub>L</sub> — 1.00—2.22 ( $1.44 \pm 0.05$ ), 8/10<sub>S</sub> — 1.25—2.50 ( $1.69 \pm 0.10$ ), 10<sub>L</sub>/10<sub>S</sub> — 1.00—1.67 ( $1.20 \pm 0.05$ ). Следует отметить, что дисперсии и средние значения для индекса длин и индекса количества  $\text{Ag}^+$ -бусин для всех ЯО-хромосом набора почти совпадали. Различия касались размаха изменчивости. В некоторых кариотипах ИЯО хромосом 8а, 8 и 10<sub>L</sub> могли не различаться между собой по длине, но всегда отли-

чались один от другого по количеству Ag<sup>+</sup>-бусин. Приведенные данные морфометрического анализа ИЯО свидетельствуют о гетероморфизме гомологичных хромосом 10 по размеру ИЯО и экспрессии зоны аргентофилии. Вероятнее всего, это связано с частой редукцией зоны аргентофилии в центральной части ИЯО хромосомы 10<sub>S</sub> (рис. 4, ряд 10<sub>S</sub>).

Для сравнения данных прометафазного и интерфазного анализа ЯО приведем также оценки размеров большего из Ag<sup>+</sup>-сегментов сестринских хроматид прометафазных хромосом. Эти данные были получены нами путем измерений на препаратах хромосом клеток СПЭВ, подвергнутых гипотонической обработке. Согласно этим измерениям, длина Ag<sup>+</sup>-ЯО прометафазной хроматиды колеблется в следующем диапазоне значений для хромосом: 8<sub>A</sub> — 0.75—2.79 мкм со средним значением  $1.73 \pm 0.11$  мкм, 8 — 0.40—1.29 ( $0.65 \pm 0.05$ ), 10<sub>L</sub> — 0.40—1.06 ( $0.68 \pm 0.04$ ), 10<sub>S</sub> — 0.42—0.98 мкм ( $0.67 \pm 0.03$ ). Для некоторых пар разноименных хромосом индивидуальной клетки нами было вычислено также соотношение длин Ag<sup>+</sup>-ЯО хроматид. Указанное соотношение колебалось в следующем диапазоне значений для пары сопоставляемых хромосом: 8<sub>A</sub>/8 — 1.11—6.38 со средним значением  $2.92 \pm 0.30$ , 8<sub>A</sub>/10<sub>L</sub> — 1.12—6.07 ( $2.74 \pm 0.26$ ), 8<sub>A</sub>/10<sub>S</sub> — 1.59—6.07 ( $3.00 \pm 0.21$ ). Хорошо видно, что как экстремальные, так и средние значения использованного индекса длин Ag<sup>+</sup>-ЯО хроматид для всех сравниваемых пар хромосом мало отличаются друг от друга.

## Обсуждение

Размер клетки и клеточного ядра, а также структура хроматина и ядрышек закономерным образом меняются в ходе клеточного цикла (Бродский, Урываева, 1981). В соответствии с этими воззрениями, приведенная нами классификация клеток СПЭВ представляет собой вариант морфометрического способа идентификации клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла. Клетки первого типа при этом, скорее всего, соответствуют клеткам в фазе G<sub>1</sub>, клетки второго типа — клеткам в поздней фазе S (подтип 1) и в фазе G<sub>2</sub> (подтип 2), а клетки третьего типа — клеткам в ранней и средней фазе S. Если это так, то из результатов проведенного анализа распределения ДНК, колокализующейся с ядрышком в клетках СПЭВ, можно сделать следующее заключение. В клетках СПЭВ с распластанным ядром, находящихся в фазах G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> и поздней фазе S клеточного цикла, но не в ранней и средней фазе S, часто выявляются линеаризованные DAPI-позитивные ядрышковые структуры. Самая крупная из таких структур индивидуальной клетки, зафиксированной на стадии G<sub>1</sub> или G<sub>2</sub> клеточного цикла, обычно содержит ярко флуоресцирующий блок хроматина. С учетом полученных нами данных рДНК-FISH линеаризованные DAPI-позитивные структуры, колокализующиеся с ядрышками в клетках СПЭВ, можно считать интерфазными ИЯО. Сделанные выводы о пространственно-временной структуре интерфазных ИЯО СПЭВ, конечно, являются предварительными и требуют подтверждения данными последующих исследований с более точной идентификацией стадии клеточного цикла.

В последнее время под ЯО понимают локусы рДНК, которые могут находиться в нескольких альтернативных

функциональных состояниях (Hernandez-Verdun, Roussel, 2003; Raška, 2003; Raška et al., 2004). В интерфазе наблюдаются как минимум три таких состояния (конформации) локуса рДНК: 1) кластер инактивированных генов; 2) кластер генов с ассоциированными факторами транскрипции, в котором могут быть активны отдельные гены; 3) рассредоточенные гены с факторами транскрипции и транскрипционной активностью.

По полученным нами данным, второе состояние локуса рДНК в ядрышках клеток СПЭВ реализуется преимущественно в фазах G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> и поздней фазе S клеточного цикла. В указанные периоды цикла некоторые ЯО в интерфазных клетках СПЭВ часто имеют вид линеаризованных структур, которые можно выявлять окрашиванием ДНК, с помощью рДНК-FISH и серебрения. Такие конфигурации ИЯО не обнаруживаются в клетках СПЭВ, находящихся в ранней и средней фазе S клеточного цикла. Поскольку распределение ядрышковой ДНК в этот период, по данным как окрашивания DAPI, так и рДНК-FISH, имеет диффузный характер, то ИЯО клеток СПЭВ основную часть фазы S, по-видимому, находятся в третьем состоянии. Судя по полученным нами результатам серебрения ИЯО, подобное рассредоточенное состояние локуса рДНК в реплицирующихся клетках СПЭВ может быть результатом скручивания ИЯО в виде меандра со сближенными витками.

В настоящей работе был использован вариант дифференциального серебрения рибосомного хроматина, с помощью которого можно избирательно окрашивать ФЦ и, возможно, узкий ободок ПФК вокруг него в кольцевидных ядрышках периферических лимфоцитов человека на мазках, фиксированных метанолом (Smetana et al., 1999). При сопоставлении картины серебрения ИЯО клеток СПЭВ и их окрашивания с помощью DAPI и рДНК-FISH хорошо видно, что наиболее интенсивно серебрятся расширенные участки ИЯО. Напротив, суженные участки ИЯО либо вовсе не серебрятся, либо серебрятся слабо (на уровне конденсированного хроматина и ниже). Согласно электронно-микроскопическим данным, в расширенных участках интерфазного ИЯО (фибрillлярного комплекса) клеток СПЭВ располагаются ФЦ (Hozak et al., 1986). Приведенные сведения, взятые в совокупности, позволяют говорить о том, что использованная методика серебрения ЯО интерфазных клеток СПЭВ в качестве Ag<sup>+</sup>-бусин всегда выявляет ФЦ. В ИЯО также часто серебрятся, хотя и заметно слабее ФЦ, соединяющие их нитевидные участки хроматид, а также дисковидные вставки конденсированного (рибосомного) хроматина. Наличие слабо серебрящегося хроматина в составе ИЯО клеток СПЭВ не является неожиданностью. Так, в центральной части ЯО метафазных хромосом человека регулярно обнаруживается осевой тяж из такого хроматина (Heliot et al., 1997). Более того, присутствие вставок слабо серебрящегося, инактивированного хроматина в составе ИЯО представляется совершенно обязательным, исходя из современных представлений о негативной регуляции активности рибосомного хроматина у эукариот. По этим представлениям, гетерохроматинизация рибосомного хроматина, по-видимому, является основным механизмом репрессии гомологичной рекомбинации в локусе рДНК. В силу этого обстоятельства формирование гетерохроматина в кластерах рДНК принято рассматривать в качестве необходимого условия как их существования, так и поддержания целостности ядрышка в клетках эукариот (см. обзоры: Carmo-Fonseca et al., 2000;

Hernandez-Verdun, Roussel, 2003; Raška, 2003; Raška et al., 2004).

По последним оценкам, относительное количество генов рPHK, неактивных в транскрипции, в диплоидных клетках эукариот колеблется в пределах 40—95 % (Grummt, 2003). Столь высокий уровень репрессии транскрипции генов рPHK осуществляется за счет механизмов формирования гетерохроматина, с одной стороны, и модуляции уровня транскрипции в эухроматине — с другой (Grummt, 2003; Grummt, Pikaard, 2003).

Таким образом, по современным представлениям, факультативный, а возможно, и интеркалярный конститутивный гетерохроматин присутствует во всех ИЯО эукариотической клетки. Содержание гетерохроматина в рибосомном хроматине интерфазной клетки, по-видимому, достаточно стабильный признак, который проходит через митоз. Такая форма наследственной изменчивости, не связанной с изменением первичной последовательности ДНК, называется эпигенетической, а наука, изучающая такие изменения, — эпигенетикой (Wu, Morris, 2001).

Нами было показано, что митотическое расщепление хроматид в зоне Ag<sup>+</sup>-ЯО является сильно задержанным по сравнению с остальной, эухроматиновой, частью хромосом (Стефанова, Демин, 2006). Данные настоящего исследования полностью подтверждают и существенным образом уточняют это заключение. Количество ЯО в исследованных интерфазных клетках СПЭВ никогда не превышало четырех. Среди изученных линеаризованных Ag<sup>+</sup>-ЯО были структуры с двунитчатыми слабо посеребренными участками, соединяющими нерасщепленные Ag<sup>+</sup>-бусяны или Ag<sup>+</sup>-диски. Ширина Ag<sup>+</sup>-структур при этом примерно вдвое превышала таковую в «одноНитчатых» Ag<sup>+</sup>-ЯО. Широкие ЯО с дискоидальной структурой были найдены также на препаратах 2D-FISH. Такие ЯО обнаруживались только в крупных ядрах с G<sub>2</sub>-рисунком хроматина. По молекулярно-цитогенетическим данным, хромосомы на стадии G<sub>2</sub> примерно вдвое шире таковых на стадии G<sub>1</sub>, но неотличимы друг от друга по длине (Lemke et al., 2002). Все эти данные указывают на то, что расширенные ЯО представляют собой двуххроматидные структуры, которые расщеплены на сестринские хроматиды в слабо серебряющихся участках. В аргентофильной зоне, соответствующей ФЦ, признаков сегрегации хроматид не обнаружено. Это означает, что задержка редупликации сестринских хроматид в зоне ЯО связана с центральной частью ФЦ, которая, скорее всего, содержит неактивный или мало активный в транскрипции хроматин. По последним данным, задержка сегрегации (точнее, когезия) сестринских хроматид является основным структурным признаком инактивированного хроматина (Azuara et al., 2003). Более того, указанная задержка не зависит от времени репликации ДНК в таком хроматине в клеточном цикле. На основании этого можно предположить, что внутри ФЦ может располагаться рано реплицирующийся гетерохроматин, а не эухроматин, инактивированный в результате модуляции транскрипции.

Можно думать, что фибриллярные комплексы, которые представляют собой агрегаты ФЦ и ПФК и выявляются в ядрах с помощью электронной томографии, далеко не всегда соответствуют ЯО, как это предполагалось ранее (Гозак и др., 1983). В работе Гозак и соавторов (Hozak et al., 1986) приведена 3D-реконструкция фибриллярного комплекса из G<sub>2</sub>-фазной клетки линии

СПЭВ. Реконструированный комплекс представлял собой линейный агрегат из восьми ФЦ, интегрированных ПФК. Индивидуальные ФЦ в составе комплекса имели диаметр 0.3—1.3 мкм и были неравномерно, а некоторые из них и не полностью окружены слоем ПФК. В работе было проанализировано 5 клеток на стадии G<sub>2</sub>. Число ФЦ на клетку при этом варьировало от 27 до 45, а число фибриллярных комплексов на клетку — от 6 до 8. Таким образом, судя по этим и приведенным в настоящей работе данным, число ФЦ и число Ag<sup>+</sup>-бусян посеребренных ЯО на клетку мало отличаются друг от друга. Напротив, число фибриллярных комплексов вдвое больше числа интерфазных ЯО, выявляемых нами и другими авторами (Zatsepina et al., 1996) в клетках СПЭВ с помощью световой микроскопии. Такое расхождение, однако, вполне объяснимо с позиции концепции наследуемого транскрипционного «глушения» в локусе рPHK (Grummt, Pikaard, 2003; Nemeth et al., 2004; Li et al., 2005). Согласно этой концепции, в составе любого ЯО должны быть постоянные сайты позднореплицирующегося гетерохроматина. У определенной части G<sub>2</sub>-фазных клеток в области таких сайтов можно ожидать появления ните-видных сужений хроматина или «смещений» хромосомной оси. Те и другие структуры хорошо видны на полученных нами изображениях ЯО хромосом 8а и 8.

Электронно-микроскопическое выявление подобных относительно мелких структур в ядрах клеток, фиксированных *in situ*, представляется нереальным по техническим соображениям. Поскольку в области структур неактивного хроматина не должно быть электронноплотного ПФК, эти структуры могут выступать в качестве «разобщителей» фибриллярных комплексов индивидуального ЯО. Мы ожидаем, однако, что на электроGRAMМАХ удастся увидеть крупные кластеры инактивированного рибосомного хроматина, например дистальный («нейамилифицированный») участок ЯО хромосомы 8а или центральный фрагмент ЯО 10<sub>S</sub>. Более того, не исключено, что ультраструктурное изображение Ag-негативного фрагмента ЯО 8а уже приведено в работе Гозак и соавторов (Hozak et al., 1986) как примыкание хроматина к фибриллярному комплексу в ядре профазной клетки СПЭВ.

В настоящем исследовании впервые удалось показать, что рисунок продольной сегментации индивидуальных Ag<sup>+</sup>-ЯО может регулярно воспроизводиться, по крайней мере в случае линеаризованных ЯО интерфазных клеток СПЭВ. Случай воспроизводимости рисунка продольной неоднородности у функционально активных хромосом (интерфазные политетные хромосомы, пахитенные хромосомы, хромосомы типа «кламповых щеток») общеизвестны и достаточно хорошо изучены (Callan, 1986; Lima-de-Faria, 1986; Жимулов, 1992). Такая неоднородность возникает и поддерживается, по-видимому, преимущественно за счет негативной регуляции транскрипции в участках хромосомы, содержащих конденсированный хроматин. Эти участки перемежаются сайтами рыхлого хроматина, для которых более характерна позитивная регуляция транскрипции с помощью многочисленных факторов ее модуляции. Упаковка хроматина в одном и том же хромосомном сайте рыхлого хроматина может варьировать в весьма широких пределах в зависимости от факторов внешней и внутренней среды.

Такая вариабельность определяет широкий спектр явлений изменчивости продольного рисунка индивидуальных хромосом и затрудняет их идентификацию,

так и локализацию (картирование) тех или иных стабильных структур инактивированного хроматина в пределах хромосомы. Напротив, пространственно-временные характеристики инактивированного хроматина стабильно воспроизводятся в ряду клеточных поколений, что позволяет не только идентифицировать индивидуальные хромосомы по морфологии, но и составлять их цитологические карты. Вместе с тем разрешение структуры хромосом (и сайтов инактивированного хроматина) находится в прямой зависимости от выраженности сайтов рыхлого хроматина в плоскости препарата. При прочих равных такая экспрессия последних сайтов всегда будет повышенный при наличии линейной конфигурации или линеаризации хромосом, а также при их умеренном продольном растягивании. Следуя приведенным рассуждениям, мы склонны думать, что конденсированному хроматину в составе ИЯО, посеребренного после фиксации метанолом, соответствуют Ag<sup>+</sup>-позитивные ФЦ, а рыхлому хроматину — Ag<sup>+</sup>-негативный ПФК. При иной схеме фиксации клеток СПЭВ, например с помощью фиксатора метанол—ледяная уксусная кислота (3 : 1), можно ожидать обратной специфичности серебрения плотного и рыхлого хроматина ИЯО. Поскольку ПФК в составе фибрillлярных комплексов СПЭВ располагается как на периферии, так и между ФЦ, рисунок позитивного серебрения ПФК скорее всего не даст обратной картины, обнаруженной нами при позитивном серебрении ФЦ, и вряд ли будет сколько-нибудь воспроизведимым. Вместе с тем ПФК-позитивное окрашивание линеаризованных ИЯО может оказаться весьма полезным инструментом при изучении пространственно-временных характеристик Ag<sup>+</sup>-негативных вставок инактивированного рибосомного хроматина.

Следует отметить, что в настоящей работе нам не удалось установить ориентацию ИЯО в хромосоме относительно центромеры ни для одной из ЯО-хромосом в кариотипе СПЭВ. В этой связи не исключено, что некоторые или даже все приведенные нами изображения линеаризованных ИЯО являются «перевернутыми», т. е. прицентромерным окажется их верхний конец, а не нижний, как можно думать исходя из рис. 4. Кроме того, на основании приведенных в работе изображений посеребренных ИЯО не представляется возможным составление детальной цитологической карты этого района ни для одной из ЯО-хромосом СПЭВ. Более того, как это хорошо видно на рис. 4, для каждой из ЯО-хромосом набора придется составлять несколько разновидностей таких цитологических карт, отличающихся разрешением ИЯО и привязкой к той или иной стадии клеточного цикла. Вполне вероятно, однако, что в простейшем случае, при составлении цитологических карт ИЯО с максимальным разрешением структуры, удастся обойтись конструированием лишь двух хромосомных карт данного района: одной для ИЯО с дискоидальным и другой для ИЯО с четковидным рисунком серебрения ФЦ. Преодоление отмеченных недостатков настоящей работы можно осуществить только в результате специальных исследований. Они могут быть выполнены при совмещении данных серебрения ФЦ и хромосомоспецифичного FISH-зондирования центромерной ДНК (или одного из плеч ЯО-хромосомы), в ходе дальнейшего развития банка изображений посеребренных ИЯО с установленной хромосомной принадлежностью.

Согласно данным прометафазного анализа, в кариотипе индивидуальной клетки СПЭВ длина Ag<sup>+</sup>-ЯО хро-

мосомы 8а в среднем втрое больше длины Ag<sup>+</sup>-ЯО любой из остальных ЯО-хромосом набора. Такой анализ, однако, не позволил дифференцировать хромосомы 8, 10<sub>L</sub> и 10<sub>S</sub> по размерам ЯО. Сопоставление индексов длин разноименных ИЯО, вычисленных для индивидуальных интерфазных клеток СПЭВ, показало, что длина Ag<sup>+</sup>-ЯО хромосомы 8а в среднем больше таковой для хромосом 8, 10<sub>L</sub> и 10<sub>S</sub> соответственно в 1.2—1.3, 1.7—1.9 и 2.0—2.2 раза. Почти идентичные значения индексов получены при сопоставлении размеров разноименных ЯО индивидуальных интерфазных клеток, осуществленном на основании счета ФЦ (Ag<sup>+</sup>-бусин или Ag<sup>+</sup>-дисков) в пределах одного ИЯО. Эти данные свидетельствуют о том, что относительно небольшая (20—30 %) амплификация рибосомного хроматина в ИЯО 8а индуцирует существенную профазную и (или) предмитотическую задержку конденсации этого ЯО по длине оси хромосомы по сравнению с хроматином остальных ЯО. По нашим данным, интерфазные ЯО хромосом 8, 10<sub>L</sub> и 10<sub>S</sub> в отличие от прометафазных ЯО соответствующих хромосом различаются между собой как по длине, так и по числу различных на них ФЦ. Интервалы средних значений индекса длин и индекса числа ФЦ на ИЯО при этом оказались очень близкими между собой: соответствующие отношения для хромосомных пар 8/10<sub>L</sub>, 8/10<sub>S</sub> и 10<sub>L</sub>/10<sub>S</sub> располагались соответственно в диапазоне 1.3—1.5, 1.5—1.7 и 1.05—1.25. Несовпадение прометафазных и интерфазных данных, на наш взгляд, можно объяснить тем, что конденсация рибосомного хроматина по длине оси хромосом 8, 10<sub>L</sub> и 10<sub>S</sub>, по-видимому, достигает некоторого верхнего порогового значения до прометафазы, что и приводит к выравниванию длин прометафазных ЯО указанных хромосом. Другое объяснение отмеченного расхождения данных — это более высокая скорость профазной и (или) предмитотической конденсации хроматина ЯО хромосомы 8 по сравнению с ЯО хромосом 10. В пользу такой трактовки, в частности, говорят полученные нами данные о повышенной экспрессии Ag<sup>+</sup>-негативного состояния прометафазного ЯО хромосомы 8 (Стефанова, Демин, 2006).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-04-49606).

### Список литературы

- Бродский В. Я. 1965. Неделяющееся ядро. В кн.: Руководство по цитологии. М.; Л.: Наука. 1 : 269—344.
- Бродский В. Я., Урываева И. В. 1981. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука. 259 с.
- Гозак П., Зацепина О. В., Ченцов С. Ю. 1983. Ультраструктура, форма и число фибрillлярных центров в G<sub>0</sub>-периоде культуры ткани почки эмбриона свиньи. Цитология. 25 (11) : 1236—1242.
- Демин С. Ю. 1997. Исследование структуры хроматина и хромосом на препаратах дериватов интерфазных ядер, полученных путем удаления оболочек ядер. I. Метод получения препаратов и морфология остаточных ядер лейкоцитов человека и эпителиоцитов кишечника хирономуса. Цитология. 39 (2/3) : 253—263.
- Демин С. Ю. 1999. Исследование структуры хроматина и хромосом на препаратах дериватов интерфазных ядер, полученных путем удаления оболочек ядер. II. Структура хроматина и ассоциация хромосом в растянутых амембранных ядрах и митотических фигурах. Цитология. 41 (1) : 66—86.

- Жимулов И. Ф. 1992. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука. 480 с.
- Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир. 243 с.
- Стефанова В. Н., Демин С. Ю. 2006. Передача рибосомного хроматина в митозе клеток эмбриональной почки свиньи (линия СПЭВ). Цитология. 48 (3) : 226—239.
- Andersen J. S., Lam Y. W., Leung A. K., Ong S. E., Lyon C. E., Lamond A. I., Mann M. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. 433 : 77—83.
- Azuara V., Brown K. E., Williams R. R., Webb N., Dillon N., Festenstein R., Buckle V., Merkenschlager M., Fisher A. G. 2003. Heritable gene silencing in lymphocytes delays chromatid resolution without affecting the timing of DNA replication. *Nat. Cell Biol.* 5 : 668—674.
- Callan N. G. 1986. Lampbrush chromosomes. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 36 : 1—252.
- Carmo-Fonseca M., Mendes-Soares L., Campos I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2 : 107—112.
- Christensen K., Brusgaard K., Malchenko S., Lohi O., Seirov O. 1996. Standardization of the american mink (*Mustela vison*) karyotype and some cosmid *in situ* hybridization results. *Arch. Zootec.* 45 : 259—265.
- De Boni U. 1994. The interphase nucleus as a dynamic structure. *Int. Rev. Cytol.* 150 : 149—171.
- DiMario P. J. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int. Rev. Cytol.* 239 : 99—178.
- Grummt I. 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Develop.* 17 : 1691—1702.
- Grummt I., Pikaard C. S. 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 641—649.
- Heliot L., Kaplan H., Lucas L., Klein C., Beorchia A., Doco-Fenzy M., Menager M., Thiry M., O'Donohue M. F., Plotton D. 1997. Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 2199—2216.
- Heliot L., Mongelard F., Klein C., O'Donohue M. F., Chassez J. M., Robert-Nicoud M., Usson Y. 2000. Nonrandom distribution of metaphase AgNOR staining patterns on human acrocentric chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 48 : 13—20.
- Hernandez-Verdun D., Roussel P. 2003. Regulators of nucleolar functions. *Prog. Cell Cycle Res.* 5 : 301—308.
- Howell W. M., Black D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 36 : 1014—1015.
- Hozak P., Zatsepina O., Vasilyeva I., Chentsov Y. 1986. An electron microscopic study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle ( $G_0$  period,  $G_2$  period, mitosis). *Biol. Cell* 57 : 197—205.
- Lemke J., Claussen J., Michel S., Chudoba I., Muhlig P., Wettermann M., Sperling K., Rubtsov N., Grummt U. W., Ullmann P. et al. 2002. The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Amer. J. Hum. Genet.* 71 : 1051—1059.
- Leung A. K., Andersen J. S., Mann M., Lamond A. I. 2003. Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem. J.* 376 : 553—569.
- Li J., Santoro R., Koberna K., Grummt I. 2005. The chromatin remodeling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO. J.* 24 : 120—127.
- Lima-de-Faria A. 1986. Molecular evolution and organization of the chromosome. Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier. 1186 p.
- Lowenstein M. G., Goddard T. D., Sedat J. W. 2004. Long-range interphase chromosome organization in *Drosophila*: a study using color barcoded fluorescence *in situ* hybridization and structural clustering analysis. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 5678—5692.
- Nemeth A., Strohner R., Grummt I., Langst G. 2004. The chromatin remodeling complex NoRC and TTF-I cooperate in the regulation of the mammalian rRNA genes *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 32 : 4091—4099.
- Olson M. O., Dundr M. 2005. The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* 123 : 203—216.
- Pliss A., Koberna K., Vecerova J., Malinsky J., Masata M., Fillova M., Raška I., Bereznay R. 2005. Spatio-temporal dynamics at rDNA foci: global switching between DNA replication and transcription. *J. Cell. Biochem.* 94 : 554—565.
- Ploton D., O'Donohue M. F., Cheutin T., Beorchia A., Kaplan H., Thiry M. 2004. Three-dimensional organization of rDNA and transcription. In: *The nucleolus*. New York: Kluwer Acad./Plenum Publ. 156—172.
- Raška I. 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13 : 517—525.
- Raška I., Koberna K., Malinsky J., Fidlerova H., Masata M. 2004. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol. Cell.* 96 : 579—594.
- Scherl A., Coute Y., Deon C., Calle A., Kindbeiter K., Sanchez J. C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J. J. 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 4100—4109.
- Smetska K., Jiraskova I., Perlaky L., Busch H. 1999. The silver reaction of nucleolar proteins in the main structural compartments of ring-shaped nucleoli in smear preparations. *Acta histochim.* 101 : 167—183.
- Sylvester J. E., Gonzalez I. L., Mougey E. B. 2004. Structure and organization of vertebrate ribosomal RNA genes. In: *The nucleolus*. New York: Kluwer Acad./Plenum Publ. 58—73.
- Wu C., Morris J. R. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science.* 293 : 1103—1105.
- Zatsepina O. V., Airapetyan V. O., Kir'yanov G. I. 1990. Nucleolar activation during artificial demethylation of DNA in cultured pig embryonic kidney cells. *Biomed. Sci.* 1 : 487—493.
- Zatsepina O. V., Schofer C., Weipoltshammer K., Mosgoeller W., Almeder M., Stefanova V. N., Jordan E. G., Wachtler F. 1996. The RNA polymerase I transcription factor UBF and rDNA are located at the same major sites in both interphase and mitotic pig embryonic kidney (PK) cells. *Cytogenet. Cell Genet.* 73 : 274—278.

Поступила 20 X 2005

#### DIFFERENTIATION OF INTERPHASE NUCLEOLUS ORGANIZERS IN EMBRYONIC PIG KIDNEY CELLS (PK CELL LINE)

S. Yu. Demin,<sup>1</sup> V. N. Stefanova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> All-Russian Research Institute of Genetics and Farm Animal Breeding RAA, St. Petersburg—Pushkin, <sup>2</sup> e-mail: vestefan@mail.ru

The prometaphase karyotype of cell line PK contains two heteromorphous pairs of nucleolus organizers that belong to chromosomes 8a and 8, and to 10L and 10S. It was proposed that such heteromorphism may promote chromosome differentiating of interphase nucleolus organizers (INOs) with linear configuration. To test

this assumption, we used two-dimensional (2D) preparations of methanol fixed PK cells surface stretched without hypotonic treatment. It was shown that in these preparations the large bulk of interphase PK cells contained 3—4 necklace-like linear structures arranged in nucleolar domains. The observed structures were positive in phase contrast and after DAPI-staining. Complimentary rDNA-FISH revealed that these structures were INOs, the largest INO in individual cells containing prominent terminal rDNA FISH/DAPI signal. In accordance with the data on prometaphase analysis, the latter INOs belong to chromosomes 8a. As reported by Smetana and co-workers (1999), proteins of the nucleolar fibrillar center reacted preferentially with silver in methanol fixed unwashed smears of human peripheral lymphocytes. It was established that the same specific silver reaction is characteristic most probably of 2D preparations of methanol fixed PK cells. Both silver stained and rDNA-FISH linearized INOs had necklace-like or banded structure with different degrees of resolution. Banded INOs consisted of transverse argyrophilic structures: dense bands and loose interbands. High resolved banded INOs revealed a longitudinal splitting (binemic structure) of interband zone. Necklace-like INOs consisted of argyrophilic beads nearly two-fold more narrow than argyrophilic bands, and uninemic or silver-negative interbead zones. Our findings evidence that necklace-like INOs are typical for G<sub>1</sub> and S phase cells, whereas banded INOs are characteristic of G<sub>2</sub> cells. Among high resolved linear INOs, we found four reproducible patterns of silver staining, which could be combined it two homologous groups. Because each given pattern is unique for individual PK cells, we concluded that the patterns under study were chromosome specific. Using prometaphase analysis data, we determined chromosome affiliation for each of the four tested patterns of INO silver staining. High resolved INOs, belonging to different chromosomes, were further compared with regard to their average length and the mean of argyrophilic bead number per individual INO, in addition to the length and argyrophilic bead number ratios calculated for different INO pairs of individual cells. Surprisingly, we found that both the ratios, detected for most heteromorphous pair of homologous chromosomes 8a and 8, made only  $1.26 \pm 0.02$ . In comparison, the similar length ratio for nucleolus organizers in chromosomes 8a and 8, calculated for individual prometaphase cells, reached  $2.92 \pm 0.30$ .